

CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されて  
いる事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed  
with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 1 年   9 月   4 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 . 0 0 1 - 2 6 7 2 3 6  
Application Number:  
ST. 10/C):            [ J P 2 0 0 1 - 2 6 7 2 3 6 ]

願            人  
Applicant(s):            株式会社テクノネットワーク四国  
                              日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社  
                              帝人株式会社

2 0 0 4 年   4 月   6 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫

【書類名】 特許願

【整理番号】 TL-P13-01

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A61K 31/135 ADY

【発明者】

    【住所又は居所】 徳島県徳島市蔵本町 3 - 1 8 - 1 5 徳島大学内

    【氏名】 木戸 博

【特許出願人】

    【識別番号】 501103000

    【氏名又は名称】 株式会社テクノネットワーク四国

【特許出願人】

    【識別番号】 592214911

    【氏名又は名称】 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

【特許出願人】

    【識別番号】 000003001

    【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】

    【識別番号】 100102314

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 須藤 阿佐子

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 044152

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗インフルエンザ薬

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アンブロキシールまたはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分とする抗インフルエンザ薬。

【請求項 2】 気道分泌液中に含まれるインフルエンザウイルス作用を示す生体内因子の分泌促進により、抗インフルエンザ作用を持つことを特徴とする請求項 1 の抗インフルエンザ薬。

【請求項 3】 インフルエンザウイルスの感染性を誘起する気道内プロテアーゼに対する阻害物質の分泌促進を介して、気道におけるインフルエンザウイルス増殖を抑制することを特徴とする請求項 2 の抗インフルエンザ薬。

【請求項 4】 さらに、粘膜免疫物質の IgA と IgG の分泌促進を介して、気道におけるインフルエンザウイルス増殖を抑制することを特徴とする請求項 3 の抗インフルエンザ薬。

【請求項 5】 さらに気道中の炎症性サイトカイン放出を抑制することを特徴とする請求項 2、3 または 4 の抗インフルエンザ薬。

【請求項 6】 インフルエンザウイルス感染の治療または予防剤である請求項 1 ないし 5 のいずれかの抗インフルエンザ薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【産業の属する技術分野】

本発明は、抗インフルエンザウイルス剤に関する。より詳細には本発明は、インフルエンザウイルス感染の治療または予防剤に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

インフルエンザウイルスは最も普通に見られる感染病原体の一つであり、特に、高齢者や小児、特定の慢性疾患を有する者、免疫不全患者においては相当な有病率及び死亡率の原因となる (Ref. 1, 2)。

インフルエンザウイルスには A、B、C 型の 3 型が報告されており、A 型が広

範な流行を引き起こし、強い病原性を示すが、B, C型は地域的、限定的な流行で病原性が弱いことが知られている。しかし、感染機構に関しては、それぞれ共通の機構が存在していると考えられる。

Ref.1: Kim HW, Brandt CD, Arrobio JO, Murphy B, Chanock RM, Parrott RH . Influenza A and B virus infection in infants and young children during the years 1957-1976. Am J Epidemiol 1979; 109: 464-479.

Ref.2: Barker WH, Mullooly JP. Impact of epidemic type A influenza in a defined adult population. Am J Epidemiol 1980; 112: 798-813.

### 【 0 0 0 3 】

インフルエンザウイルスの病原性は、個々のウイルスゲノムの多型性と主にウイルスエンベロープ糖蛋白〔赤血球凝集素 (HA) 〕が限定的に開裂されることで、インフルエンザウイルスの膜融合活性が誘発され、ウイルス膜と細胞膜の融合を引き起こし、ウイルスゲノムが細胞質内に入るのを許す気道の宿主細胞が分泌するトリプシン型プロテアーゼによって決められる (Ref.3-5) 。

Ref.3: Klenk HD, Garten W. Host cell proteases controlling virus pathogenicity. Trends Microbiol 1980; 2: 39-43.

Ref.4: Klenk HD, Rott R. The molecular biology of influenza virus pathogenicity. Adv Virus Res 1988; 34: 247-281.

Ref.5: Homma M, Ohuchi M. Trypsin action on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. J Viro 1973; 12: 1457-1465.

### 【 0 0 0 4 】

ウイルスエンベロープ糖蛋白のプロテアーゼによる開裂は、気道上皮細胞の膜上及び／または気道腔中において起こる (Ref.6,7) 。

Ref.6: Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Kutunuma N. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. J Biol Chem 1992; 267: 13573-13579.

Ref.7: Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, Kido H. Trypsinase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is inv

olved in pneumopathogenicity. J Virol 1992; 66: 7211-7216.

【 0 0 0 5 】

ウイルスエンベロープ糖蛋白を開裂するプロテアーゼの活性は、上気道における粘液プロテアーゼインヒビター (MPI) (Ref.8) 、及び下気道における肺サーファクタント (PS) (Ref.9) のような気道分泌液に含まれる上記プロテアーゼの内因性阻害性化合物によって厳密に調節されている。肺のPSに含まれるサーファクタント蛋白A (SP-A) は、シアール酸の付加されたC型レクチンに属し、この蛋白質は直接インフルエンザウイルスHAと結合して、ウイルスの細胞内侵入を阻害する (Ref.10) 。気道分泌液に含まれるこれらの化合物の他に、粘膜免疫システムがウイルスの細胞内侵入を防止する主要な免疫学的防御システムであり、具体的には免疫グロブリンのIgA及びIgGの局所的分泌の誘発がインフルエンザウイルス感染に対する防御と密接に関連している (Ref.11-13) 。これらの結果は、気道分泌液中に含まれるこれら抗ウイルス生体防御物質の濃度がインフルエンザウイルス感染に対する個体の感染感受性を決定することを示唆する。

Ref.8: Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H. Human Mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. J Biochem 1997; 121: 309-316 .

Ref.9: Kido H, Sakai K, Kishino Y, Tashiro M. A pulmonary surfactant is a potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza virus. FEBS Lett 1993; 322: 115-119.

Ref.10: Benne CA, Kraaijeveld CA, van Strijp JAG, Brouwer E, Harmsen M, Verhoef J, van Gold LMG, van Iwaarden JF. Interactions of surfactant protein A with influenza A viruses: binding and neutralization. J Infect Dis 1995; 171: 335-341.

Ref.11: Liew FY, Russell SM, Appleyard G, Brand CM, Beale J. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. Eur J Immunol 1984; 14: 350-356.

Ref.12: Tamura S, Funato H, Hirabayash Y, et al. Functional role of respiratory tract haemagglutinin-specific IgA antibodies in protection against influenza. Vaccine 1990; 8: 479-485.

Ref.13: Wright PF, Murphy BR, Kervina M, Lawrence EM, Phelan MA, Karzon DT. Secretory immunological response after intranasal inactivated influenza A virus vaccinations: evidence for immunoglobulin A memory. Infect Immun 1983; 40: 1092-1095.

#### 【 0 0 0 6 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

去痰剤あるいは喀痰溶解薬として知られているアンブロキシソール (2-amino-3, 5-dibromo-N-[trans-4-hydroxycyclohexyl]benzylamine) は、慢性気管支炎及び新生児呼吸窮迫症候群の治療に用いられてきた (Ref.14)。

アンブロキシソールの薬理学的作用は、気道の腺細胞上での粘液調節として、またPS産生を増進させる薬剤として報告されている (Ref.15)。

さらに、アンブロキシソールは、抗酸化作用 (Ref.16) や気管支肺胞マクロファージ、単球及び顆粒球からの炎症性サイトカイン放出の低減 (Ref.17,18) を伴う抗炎症作用を示す。しかし、In vivo におけるインフルエンザウイルス感染に対するアンブロキシソールの作用はこれまでほとんど知られていない。

Ref.14: Germouty J, Jirou-Najou J. Clinical efficacy of ambroxol in the treatment of bronchial stasis. Respiration 1987; 51: 37-41.

Ref.15: Heath MF, Jacobson W. The inhibition of lysosomal phospholipase A from rabbit lung by ambroxol and its consequences for pulmonary surfactant. Lung 1985; 163: 337-44.

Ref.16: Gillissen A, Scharling B, Jaworska M, Bertling A, Rasche K, Schultze-Werninghaus G. Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine AC. Res Exp Med(Berl)1997; 196: 389-398.

Ref.17: Pfeifer S, Zissel G, Kienast K, Muller-Quernheim J. Reduction of cytokine release from blood and bronchoalveolar mononuclear cells by a

mbroxol. Eur J Med Res 1997; 2: 129-132.

Ref.18: Gibbs BF, Schmutzler W, Vollrath IB, Brostharardt P, Braam U, Wolff HH, Zadlo-Klarwasser G. Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells. Inflamm Res 1999; 48: 86-93.

#### 【 0 0 0 7 】

本発明は、抗酸化作用があり、PSの放出を促進する喀痰溶解剤であるアンブロキシソールの、インフルエンザウイルス感染に対する防御効果を用いて、抗インフルエンザウイルス剤、すなわち、インフルエンザウイルス感染の治療または予防剤を提供することを目的とする。

#### 【 0 0 0 8 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明は、アンブロキシソールまたはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分とする抗インフルエンザ薬を要旨としている。

#### 【 0 0 0 9 】

気道分泌液中に含まれる抗インフルエンザウイルス作用を示す生体内因子（生体防御物質群）の分泌促進により、抗インフルエンザ作用を持つことを特徴としており、その場合、本発明は、アンブロキシソールまたはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分とし、気道分泌液中に含まれる抗インフルエンザウイルス作用を示す生体内因子の分泌促進により、抗インフルエンザ作用を持つことを特徴とする抗インフルエンザ薬を要旨としている。

#### 【 0 0 1 0 】

インフルエンザウイルスの感染性を誘起する気道内プロテアーゼに対する阻害物質、さらに粘膜免疫物質のIgAやIgGの分泌促進を介して、気道におけるインフルエンザウイルス増殖を抑制することを特徴としており、その場合、本発明は、アンブロキシソールまたはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分とし、気道分泌液中に含まれる抗インフルエンザウイルス作用を示す生体内因子としてのMPIやPS、さらに粘膜免疫物質のIgAやIgGの分泌促進によりインフルエンザウイルス増殖を抑制することを特徴とする抗インフルエンザ薬を要旨としている。

## 【0011】

さらに気道中の炎症性サイトカイン放出を抑制することを特徴としており、その場合、本発明は、アンブロキシソールまたはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分とし、気道分泌液中に含まれる抗インフルエンザウイルス因子としてのMP IやPS、さらに粘膜免疫物質のIgAやIgGの分泌促進によりインフルエンザウイルス増殖を抑制すること、さらに気道中への炎症性サイトカイン放出を抑制することを特徴とする抗インフルエンザ薬を要旨としている。

## 【0012】

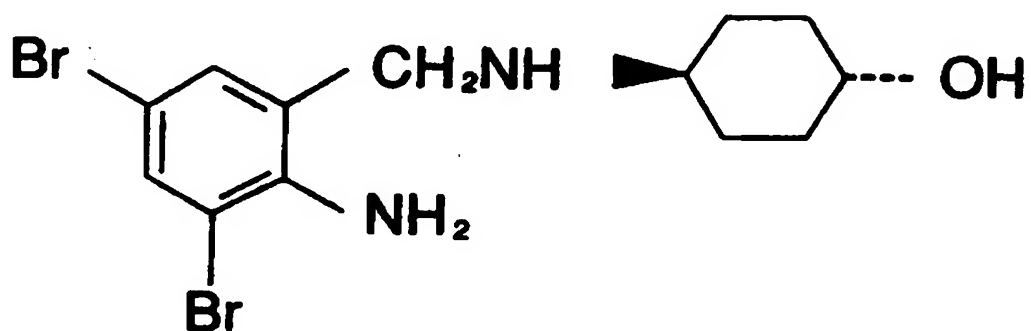
本発明の抗インフルエンザ薬は、インフルエンザウイルス感染の治療または予防剤である。

## 【0013】

## 【発明の実施の形態】

本発明で用いるアンブロキシソール (2-amino-3,5-dibromo-N-[trans-4-hydroxycyclohexyl]benzylamine) について、化1で示されるその塩酸塩〔一般名：塩酸アンブロキシソール (Ambroxol Hydrochloride)、化学名：trans-4-[(2-amino-3,5-dibromobenzyl)amino]cyclohexanol hydrochloride〕は、去痰剤あるいは喀痰溶解薬としてドイツをはじめとする世界各国で広く臨床応用されている薬剤であり、前述のとおり慢性気管支炎及び新生児呼吸窮迫症候群の治療に用いられてきた。

## 【化1】





## 【0014】

本発明の予防及び治療剤におけるウイルス疾患としては、外膜糖蛋白を有するウイルスにより気道部で感染発症するものであればよく、例えば、インフルエンザウイルス、パラインフルエンザウイルス、レスピラトリーシンシシャルウイルス (Respiratory Syncytial Virus)、麻疹ウイルス又はムンプスウイルスを原因とする疾患が挙げられる。

## 【0015】

本発明の抗インフルエンザウイルス剤は、通常の薬剤組成物と同様に、錠剤、散剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤、懸濁剤、トローチ剤、チュアブル剤などの経口固形製剤およびエリキシル剤、シロップ剤（ドライシロップも含む）などの液剤などの形態で投与することができる。また、経口投与に不向きであったり、局所投与を選択することでより早くより確実な薬効が求められる場合には、従来用いられている液剤注入、ミスト噴霧やネブライザー注入法、およびスピンヘラーやディスクヘラーを用いた粉末吸入器 (dry powder device; DPD) や定量噴霧式吸入器 (metered dose inhaler; MDI) などの方法で投与される。これらの場合、利便性、確実性、効率などの点を考慮して選択される。

## 【0016】

服用および投与用量は製剤形態によって適宜調整できる。

錠剤などの経口固形製剤、経口液剤などとして1日服用量を1回ないし数回に分けて服用してもよい。また、例えばシロップやトローチ、チュアブル錠などの幼児頓服して、局所で作用させるとともに内服による全身性作用をも発揮させる製剤形態では1日服用量の1/2～1/10を1回量として配合し服用すればよく、この場合全服用量が1日量に満たなくてもよい。逆に、製剤形態からみて無理な服用容量とならなければ1日服用量に相当する量を1回分として配合してもよい。また、局所適用を目的とした液剤注入剤やミスト噴霧剤、ネブライザー注入法、粉末吸入法などによる場合は、内服用経口剤の投与量の1/10～1/100に調製して用いてよい。

## 【0017】

製剤の調製にあたっては、通常使用される充填剤、増量剤、結合剤、崩壊剤、

表面活性剤、滑沢剤、コーティング剤、徐放化剤など、希釈剤や賦形剤を用いることができる。この他、必要に応じて溶解補助剤、緩衝剤、保存剤、可溶化剤、等張化剤、乳化剤、懸濁化剤、分散剤、増粘剤、ゲル化剤、硬化剤、吸収剤、粘着剤、弾性剤、可塑剤、吸着剤、香料、着色剤、矯味剤、抗酸化剤、保湿剤、遮光剤、光沢剤、帯電防止剤などを使用することができる。

より具体的には、賦形剤として、乳糖、コーンスターチ、マンニトール、D-ソルビトール、結晶セルロース、エリスリトール、白糖など、結合剤としてはヒドロキシプロピルセルロース(HPC-L)、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、メチルセルロース、 $\alpha$ 化デンプンなど、崩壊剤にはカルメロースカルシウム、クロスカルメロースナトリウム、架橋化ポリビニルピロリドンなど、滑沢剤としてはステアリン酸マグネシウム、タルクなどである。また、香料としては1-メントール、バニリン、レモン油、ケイヒ油、ハッカ油などのフレーバーや芳香油が挙げられ、吸着剤には合成ケイ酸アルミニウム、軽質無水ケイ酸などを配合することができる。また、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、メチルセルロース、ポリビニルピロリドンなど通常用いられるコーティング剤でコーティング製剤とすることもできる。また、必要とすれば、特にトローチ剤やシロップ剤、チュアブル剤などにおいては甘味剤を用いることができる。すなわち、マンニトール、ブドウ糖、麦芽糖、水飴、マルツエキス、マルチトール、ソルビトール、白糖、黒砂糖、果糖、乳糖、蜂蜜、キシリトール、甘茶、サッカリン、アスパルチルフェニルアラニンエステルなどやその他マルトオリゴ糖、マルトシルシクロース、還元イソマルチュロース、ラフィノースなどのオリゴ糖などが挙げられる。これらを用いての製剤化は、その製剤形態に応じて、当該分野で知られている方法、慣用の方法そして常法のいずれかの方法により行うことができる。

#### 【0018】

散剤、細粒剤、顆粒剤などの粉粒体制剤（定量噴霧吸入器(MDI)や粉末吸入器(DPD)なども含む）では飛散性、付着性などの性状を考慮して適宜目的とする製剤の調製を行うことができ、例えば、粉体の嵩、飛散性、付着性、吸湿性、帯電性、ぬれ、溶解性等の物性、粒子の粒度(粒径)、表面積、形状などの性質を考慮し

て製剤となすことが好ましい。具体的には、粉末吸入法では薬物を効率的に痰患部に到達させるために薬剤成分の粒子径に注意を払わなければならないとされており、最も適した粒子径は $0.5\sim 5.0\mu\text{m}$ とされている。また、取り扱いの便や吸湿、分解、変質、変色などの防止も考慮して調製することが好ましい。粉末の調製には粉碎方法として、乾式粉碎法、湿式粉碎法、低温粉碎法、ジェット粉碎法、回分式粉碎法、連続開回路粉碎法、連続閉回路粉碎法、などの従来用いられている方法により適宜選択したり、その目的に応じてそれらを組み合わせて行うことができる。

#### 【0019】

##### 【作用】

アンブロキソールは、気道内の抗ウイルス因子の分泌促進効果により気道におけるインフルエンザウイルス増殖を抑制する作用が認められる。アンブロキソール作用は、SP-A、MPI、IgA、IgG等のウイルス増殖阻害物質の気道内濃度の上昇、また気道分泌液中への炎症性サイトカイン放出の抑制によって説明されるであろう。

#### 【0020】

##### 【実施例】

本願発明の詳細を実施例で説明する。本願発明はこれら実施例によって何ら限定されるものではない。

#### 【0021】

##### 実施例

##### 《概要》

抗酸化特性があり、さらにPSの放出を刺激する咳痰溶解剤であるアンブロキソールの、インフルエンザウイルス感染に対する防御作用をマウスにおいて研究した。

致死量のインフルエンザA/Aichi68 (H3N2) ウイルスを鼻腔内に感染した後に、マウスにアンブロキソールまたは賦形剤を1日2回腹腔内投与し、生存率、BALF中のウイルス力価、サイトカイン及びBALF中の抗ウイルス因子、すなわち粘膜免疫IgAおよびIgG、ならびにPSおよびMPIの濃度を分析した。

アンプロキソールはウイルス増殖を有意に抑制し、マウスの生存率を著明に改善した。生存率の測定において、アンプロキソールの作用は10mg/kg/日で最大に達し、それより高い用量では効果は小さくなった。しかし、高い用量の場合でも、コントロールとして用いた生理食塩水投与群よりは生存率の改善を見た。インフルエンザウイルス感染は気道分泌液中の抗ウイルス因子及び炎症性サイトカインを誘発し、アンプロキソールはこれら抗ウイルス因子群の放出をさらに促進したが、それはまたウイルス増殖を助長するトリプシン型プロテアーゼの放出をも促進した。さらに、アンプロキソールは一過性にサイトカイン、すなわち、tumor nectosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、interferone- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、interleukin-2(IL-2)の気道液中への放出を抑制した。

アンプロキソールには生体内でのウイルス増殖に関与する幾つかのネガティブな作用を認めるが、全体的にはウイルス増殖を抑制する気道内物質群のレベルを顕著に上昇させ、インフルエンザウイルス感染の有効な治療としての臨床適用を示唆している。

#### 【 0 0 2 2 】

致死量のマウス適応型インフルエンザウイルス A/Aichi/68(H3N2)の鼻腔内感染後のマウスに対するアンプロキソールの作用を試験し、生存率、ウイルス力価及び気道分泌液中のウイルス増殖とトリプシン型プロテアーゼ、MPI, PS, I g A, I g G 及びサイトカインのレベルを試験した。

##### 《対象と方法》

##### 1) 動物及び対象

特異病原フリーのメス、生後3週間、体重8-10gのoddYマウスをJapanSLCInc. (静岡、日本) から購入した。マウスはすべて徳島大学の動物実験ガイドラインに基づいて行った。アンプロキソールはBoehringerIngelheimから供与された。ブタ膵臓トリプシンをSigmaから購入した。マウス適応インフルエンザA/Aichi/68(H3N2) ウイルス (Ref. 19) は卵齢10日の有胚卵において増殖させた後に用いた。

Ref.19: Ovcharenko AV, Zhirnov OP. Aprotinin aerosol treatment of influenza and paramyxovirus bronchopneumonia of mice. Antiviral Res. 1994;

23: 107-118.

### 【 0 0 2 3 】

#### 2) ウイルス感染とアンプロキシソールの投与方法

エーテル麻酔下で、マウスを $6.6 \times 10^4$ プラーク形成単位 (PFU) のインフルエンザ A/Aichi/68 (H3N2) ウイルスを投与量  $20 \mu\text{l}$  で鼻腔内感染させた。感染直後の 10 ～ 15 分以内に、10匹から成る1群に腹腔内 (i.p.) に食塩水に混ぜたアンプロキシソール  $200 \mu\text{l}$  をそれぞれ2、5、10、15mg/kg体重で投与した。以後同様の投与を1日2回、7 - 10日間行った。気道分泌液中の様々な化合物及び所定の病理学的変化を分析するための実験では、0、10、30mg/kg/日のアンプロキシソールで治療する3群の動物を選択した。各群に80匹の動物を使用した。BALF中のウイルスレベルは、報告したように (Ref.20) 免疫蛍光細胞計数法 (immurofluorexant cell-counting method) によって測定した。

Ref.20: Tashiro M, Homma M. Pneumotropism of Sendai virus in relation to proteasemediated activation in mouse lungs. Infect Immun 1983; 39: 879-888.

### 【 0 0 2 4 】

#### 3) BALFの調整

1群80匹のマウスはアンプロキシソールで治療した群、または治療しない群、あるいはインフルエンザウイルスを感染させた群または感染させなかった群として、1群80匹のマウスを使用した。各群から毎日少なくとも5匹のマウスを選択し、マウスからBALF [Singh等の方法 (Ref.21) により] を7日間毎日採取した。BALFは使用するまで $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。

Ref.21: Singh G, Katyal SL. An immunologic study of the secretory products of rat clara cells. J Histochem Cytochem 1984; 32: 49-54.

### 【 0 0 2 5 】

#### 4) BALF中のSP-A, サイトカイン及び免疫グロブリンの測定

マウスとラットのSP-Aのアミノ酸配列には95%の同一性があり (Ref.22,23)、分離したラットSP-Aに対するポリクローナル抗体が (Ref.6,24) マウスSP-Aに反応した。そこで、マウスのBALF中のSP-A濃度を非ビオチン化とビオチン化した

ラットのSP-Aに対する特異抗体を用いたenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) システムを作成し、マウスSP-Aを標準検量線物質として分析した。BALF中のサイトカイン [TNF- $\alpha$ 、IL-2、IFN- $\gamma$ 、interleukin-6(IL-6)、interleukin-4(IL-4)] のレベルはELISA kits (Bio-source International, CA, USA) を用いて、製造元のプロトコールに基づいて測定した。BALF中のIgG及びIgAのレベルもELISA kits (Bethyl, TX, USA) を用いて測定した。490 nmまたは450nmにおける吸光度をImmuno Mini NJ-2300 multiplate-readerによって読み取った。

Ref.21: Singh G, Katyal SL. An immunologic study of the secretory products of rat clara cells. J Histochem Cytochem 1984; 32: 49-54.

Ref.22: Korfhagen TR, Bruno MD, Glasser SW, et al. Murine pulmonary surfactant SP-A: gene cloning, sequence, and transcriptional activity. Am J Physiol. 1992; 263: L546-554.

Ref.23: Lacaze-Masmonteil T, Fraslon C, Bourban J, Raymondjean M, Kahn A. Characterization of the rat pulmonary surfactant protein A promoter. Eur J Biochem 1992; 206: 613-623.

Ref.24: Sakai K, Kweon MN, Kohri T, Kishino Y. Effects of a pulmonary surfactant and surfactant protein A on phagocytosis of fractionated alveolar macrophages: relationship to starvation. Cell Mol Biol 1992; 38: 123-130.

#### 【 0 0 2 6 】

##### 5) 酵素及びインヒビター測定

トリプシン型プロテアーゼ活性の測定はすでに述べたように (Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Kutunuma N. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. J Biol Chem 1992; 267:13573-13579.)、インフルエンザウイルスHAの開裂部位認識共通配列 (consensus cleavage motif) に類似しているN-tert-butoxycarbonyl-Gln-Ala-Arg-4-methyl-coumaryl-7-amideを基質として用いて分析した。BALF中におけるインフルエンザウイルスのHA開

裂プロテアーゼの阻害物質の 9 0 % を示す MPI (Ref. 25, 26) の阻害活性は、以下の  
ように分析した。酸と熱に安定な MPI の性質を利用して、MPI を 5% (v/v) 過塩素  
酸で処理して大部分の蛋白質を遠心除去した BALF の上澄を採取し、さらに 100℃  
で 10 分間ボイルした。その後上澄を 1500xg で 15 分間遠心分離し、4M KOH で pH 7.0  
に調整し、上澄のプロテアーゼ阻害活性をすでに述べられているように分析した  
(Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H. Human Mucus  
protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound  
against infection with influenza A and Sendai viruses. J Biochem 1997; 1  
21: 309-316 .) 。

Ref.25: Stolk J, Rossie W, Dijkman JH. Apocynin improves the efficacy  
of a secretory leukocyte protease inhibitor in experimental emphysema. A  
m J Respir Crit Care Med 1994;150: 1628-1631.

Ref.26: Ohlsson K, Tegner H, Akesson U. Isolation and partial characteri-  
zation of a low molecular weight acid stable protease inhibitor from h  
uman bronchial secretions. Hoppe Seylers Z Physiol Chem 1977; 358: 583-5  
89.

#### 【 0 0 2 7 】

##### 《統計》

すべての値は平均値±SDで表した。アンプロキソールで治療した群と治療しな  
かった対照群との有意な差は、paired Student's  $t$ -testを用いて評価し、 $P<0.$   
05の値を有意と見なした。

#### 【 0 0 2 8 】

##### 《結果》

1) アンプロキソールはインフルエンザウイルス感染マウスの生存率を著明に  
改善した。

アンプロキソールがインフルエンザ A/Aichi/68(H3N2) ウイルス感染マウスの  
生存率を上昇させることを図 1 に示す。図 1 中、マウスは  $6.6 \times 10^4$  PFU のインフル  
エンザ A/Aichi/68(H3N2) ウイルスで感染させ、その後食塩水(●)、アンプロキシ  
ール 4 (▲)、10 (■)、20 (△)、30 (□) mg/kg/日を腹腔内に注入した。各群のマウ

ス(10匹)の生存率を10日間分析した。

前述したようにアンブロキソールは肺および気管支へのPSの分泌を刺激すること、さらに抗酸化作用と抗炎症特性を示すことがすでに報告されている。これらの所見を生かし、感染力と進行性の強いインフルエンザA/Aichi/68(H3N2)ウイルスを感染させたマウスに対するアンブロキソールの作用を分析した。体重8-10gのマウスに致死量に相当するインフルエンザAウイルスを鼻腔内感染させ、様々な用量のアンブロキソールを1日2回腹腔内に注射した。アンブロキソール自体は30mg/kg/日までは何の毒性も示さなかった。

ウイルス感染後、2日目から体重の有意な減少が認められ、アンブロキソール治療を行わなかった全例(n=10)が10日以内に死亡した。アンブロキソール治療群では、用量に依存して感染マウスの生存率が改善され、用量10mg/kg/日でピークであったが、それ以上の用量では生存率の改善効果は小さくなった(図1)。マウスを用量10mg/kg/日のアンブロキソールで治療すると、感染マウスの半数が致死感染であるにもかかわらず生存した。

#### 【0029】

2) アンブロキソール治療群ではウイルスの増殖が抑制された。

BALF中のウイルス増殖に対するアンブロキソールの抑制作用(A)、及び感染後4日目のマウスにおける肉眼的肺病変を図2に示す。

A：各群のマウス(80匹)をインフルエンザA/Aichi/68(H3N2)ウイルスに感染させ、その後図1の説明に述べたように、食塩水(●)、アンブロキソール10(△)及び30(▲)mg/kg/日で治療した。感染及び治療後、5匹の生存マウスのBALFを7日間毎日採取した。BALFのウイルス力価を前述の免疫蛍光細胞計数法(Ref. 20)によって測定し、細胞感染単位(cell infecting unit, CIU)で表した。データは平均値±SD(n=5)として表現した。Student's t-testにより、食塩水とアンブロキソールで治療したマウスについての値間での有意差を検定した。\* $P < 0.01$ 。

B：非感染群4日目でのマウスの肺(n=5)(1)、インフルエンザウイルスに感染させ食塩水で治療した群の肺(2)、インフルエンザウイルスに感染させアンブロキソール10(3)、30(4)mg/kg/日で治療した群におけるマウスの肉眼的肺病変。

アンブロキソールによる感染マウスの生存率改善の根底にある機序を分析する



ために、免疫蛍光細胞計数法によってBALF中のウイルス価を測定した。

マウスにインフルエンザAウイルスを鼻腔内に感染させ、2日経過したところで、BALF中のウイルス力価は増加を始め、5日目で最大に達し、6日目以後BALF中のウイルス力価は急速に減少して7日目で感染2日目に相当する力価にまで減少した。これは恐らく宿主の免疫学的反応の結果と推定される（図2A）。用量10mg/kg/日でのアムプロキソール治療群では、ウイルス増殖を有意に抑制したが、用量30mg/kg/日の処理群での効果はそれより小さかった。感染後4日目の肺の病理学的変化、肉眼的肺病変を分析した（図2B）。感染マウスでは発赤を伴う肺に重度の広範囲な肝臓様病変が観察された。用量10mg/kg/日のアムプロキソール治療群では病理学的変化は著明に減少し、用量30mg/kg/日での病変抑制効果はそれよりも小さかった。

感染マウスのウイルス増殖は7日目ではほぼ停止し、ウイルスは気道から排除されたが、肺の病理学的変化はその後も軽度の進行を伴って継続し、動物は10日以内に死亡した。感染マウスの生存率の改善及びウイルス増殖抑制効果におけるアムプロキソールの作用機序を解明するために、インフルエンザウイルスの複製を調節するBALF中の様々な細胞因子及び炎症性サイトカインに対する、アムプロキソールの作用を分析した。

### 【0030】

3) 気道分泌液中におけるインフルエンザウイルス複製の促進因子と抑制因子の濃度に対するアムプロキソールの作用。

Tryptase Claraのような気道に分泌されるトリプシン型プロテアーゼは、インフルエンザウイルスのHAをHA1とHA2に解裂させ、その結果、ウイルス膜融合活性及びウイルス複製を促進する（Ref.6,7）。このプロテアーゼ活性は、MPI（Ref.8）及びPS（Ref.9）のような、内因性阻害物質によって抑制される。従って、これら阻害物質のBALF中の濃度に対するアムプロキソールの作用を分析し、結果を表1（インフルエンザAウイルス感染マウスのBALFにおけるトリプシン様プロテアーゼ活性、PS及びMPIに対するアムプロキソールの作用）に示した。

トリプシン型プロテアーゼは、通常、非感染マウス及びラットにおいて気道内のプロテアーゼ阻害物質よりも多く分泌されていて、インフルエンザウイルスは

常に感染できる状態にある (Ref. 6, 9)。インフルエンザウイルスを感染させると、トリプシン型プロテアーゼの濃度は、6 日目をピークとして約 6.4 倍増大した。用量 10mg/kg/日でのアンブロキシソール治療をした群では、1 日目からプロテアーゼの分泌増加が誘発され、5 日目でピークに達した。用量 30mg/kg/日のアンブロキシソール投与群ではさらにそのレベルが上昇したが、ピークは 4 日目と早くなり、その後急速に低下する傾向を呈した。感染していないマウスにおいても、BALF 中のトリプシン型プロテアーゼはアンブロキシソールによる分泌促進が認められた (表 2)。用量 10 及び 30mg/kg/日のアンブロキシソール投与群は 4 日目をピークとして、それぞれ 2.2 倍及び 2.4 倍トリプシン型プロテアーゼレベルを上昇させた。

SP-A 及び MPI のレベルに対するアンブロキシソールの作用を分析した [表 1 及び 2 (インフルエンザウイルス感染群、および感染無しの群におけるマウス BALF のトリプシン様プロテアーゼ活性、PS 及び MTI に対するアンブロキシソールの作用)]

インフルエンザウイルス感染はこれら抗インフルエンザ活性を持つ生体防御物質の SP-A、MPI の分泌を、6 日目をピークとしてそれぞれ 6 倍及び 4.4 倍増大させた。感染マウス群でのアンブロキシソールによる治療は、MPI 及び SP-A の濃度を投与後第 1 日目より急激にしかも著明に増加させ、ピーク値でそれぞれベース濃度の 9-10 倍及び 8.4 倍にまで増加させた。感染マウスを 10mg/kg/日のアンブロキシソールにより治療した群では、MPI 及び SP-A のレベルは第 1 日目の急激な増加の後濃度は徐々に上昇し、5 日目をピークとして、7 日目まで高い濃度に維持された。しかし、マウスをアンブロキシソール 30mg/kg/日で治療したところ、第 1 日目の急激な増加の後、4 日目をピークとしてその後急速に消失した。非感染マウス群の SP-A 及び MPI の分泌に対してもアンブロキシソールは軽度ながら分泌促進作用が観察された。

【 0 0 3 1 】

【表 1】

調節因子	アンブロキシールの 用量[ng/kg/日]	ウイルス感染後の日数							
		0	1	2	3	4	5	6	7
トリプシン様 プロテアーゼ活性 [μU/ml]	0	25.0±10.0	38.4±2.9	70.0±8.8	99.0±28.3	125.0±2.9	146.8±21.0	160.0±21.0	124.0±30.0
	10		56.0±2.3*	81.0±10.0	135.0±17.0	156.6±25.0	201.5±20.0*	172.0±30.0	175.0±26.0
	30		60.0±10.0*	90.0±12.5	129.0±33.7	221.5±38.0*	148.0±19.8	137.0±17.0	53.0±15.0*
SP-A [ng/ml]	0	2.1±0.6	2.3±0.1	6.0±2.1	8.6±3.2	9.2±4.6	10.4±2.2	12.5±1.5	7.3±1.9
	10		9.4±3.9*	14.5±2.6*	14.8±2.9	15.6±3.4	19.1±3.5*	16.5±3.1	15.1±3.1*
	30		11.3±1.1*	14.5±3.3*	16.0±5.1	21.1±6.0*	12.4±1.2	12.1±1.7	4.9±1.5
MPI [μU/ml]	0	110.0±56.0	123.0±25.0	188.6±61.0	256.0±71.4	360.0±97.0	425.0±120.0	143.0±69.0	329.0±81.0
	10		200.0±20.0*	396.7±62.6*	480.0±120.0*	587.6±147.0*	933.0±170.0*	600.0±98.0	660±180.0*
	30		305.0±18.3*	518.3±183.0*	753.0±216.0*	929.2±95.0*	800.0±134.0*	500.0±61.0	156.0±30.0*

データは平均±SDとして表した。各時点 n=5。各日におけるアンブロキシール治療有り、無し群間の有意差はStudent's t-testによって評価した。\*p<0.05

【0032】

【表 2】

調節因子	アンブロキシソールの 用量[ng/kg/日]	ウイルス感染後の日数							
		0	1	2	3	4	5	6	7
トリプシン様 プロテアーゼ活性 [μU/ml]	0	25.0±2.0	25.0±1.8	20.0±1.5	20.0±5.0	25.0±6.0	25.0±8.0	20.0±10.0	25.0±8.0
	10		26.7±3.0	30.0±10.0	33.4±1.6*	55.0±16.0*	50.0±13.0*	20.0±9.1	25.0±10.0
	30		26.7±2.4	33.4±18.0	40.0±11.0*	60.0±22.0*	25.0±10.0	20.0±7.7	20.0±6.0
SP-A [ng/ml]	0	2.2±0.3	2.4±0.8	2.7±1.1	2.4±1.0	2.7±0.9	2.3±0.7	2.7±0.8	2.5±1.0
	10		3.0±0.9	3.4±1.1	4.3±2.2	5.6±1.4*	6.8±3.0*	6.2±2.2*	7.4±3.1*
	30		3.9±1.7	5.2±1.0*	5.6±1.9*	8.3±1.2*	7.2±3.1*	6.9±2.8*	6.6±2.1*
MPI [μU/ml]	0	112.5±30.0	125.0±26.0	130.0±50.0	167.0±40.0	200.0±98.0	130±32.0	200.0±50.0	165.0±50.0
	10		150.0±40.0	200.0±50.0	250.0±60.0*	300.0±50.0*	500±70.0*	470.8±50.0*	430.0±100.0*
	30		200.0±60.0	250.0±70.0	458.5±60.0*	550.0±80.0*	500±60.0*	250.0±80.0	167.0±70.0

データは平均 $\pm$ SDとして表した。各時点 n=5。各日におけるアンブロキシソール治療有り、無し群間の有意差はStudent's t-testによって評価した。\*p<0.05

【0033】

4) アンブロキシソールは粘膜免疫IgA及びIgGの分泌を促進する。

次に、BALF中の粘膜免疫IgA及びIgGの分泌に対するアムプロキソールの作用を分析した（図3及び図4）。

非感染マウス群(A)及びインフルエンザAウイルス感染マウス群(B)のBALFにおける粘膜免疫IgAレベルに対するアムプロキソールの分泌促進作用を図3に示す。図中、食塩水(白棒)、アムプロキソール10mg/kg/日(黒棒)、30mg/kg/日(斜線棒)によって治療した非感染群(A)及び感染群(B)マウスのBALFにおけるIgAレベルを、7日間測定した。データは平均値±SD(n=5)として表した。Student's t-testにより、食塩水とアムプロキソールで治療したマウスについての値間で\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 。

#### 【0034】

非感染マウス群(A)及びインフルエンザAウイルス感染マウス群(B)のBALFにおける粘膜免疫IgGレベルに対するアムプロキソールの分泌促進作用を図4に示す。図中、食塩水(白棒)、アムプロキソール10mg/kg/日(黒棒)、30mg/kg/日(斜線棒)によって治療した非感染群(A)及び感染群(B)マウスのBALFにおけるIgGレベルを、7日間測定した。データは平均値±SD(n=5)として表した。Student's t-testにより、食塩水とアムプロキソールで治療したマウスについての値間で\* $P<0.05$ 。

#### 【0035】

インフルエンザウイルスの鼻腔内接種は、粘膜免疫IgA及びIgGの分泌を際立って促進し、これら抗体のレベルはウイルス増殖抑制の程度と相関関係があると考えられている(Liew FY, Russell SM, Appleyard G, Brand CM, Beale J. Cross-protection in mice infected with influenza A virus by the respiratory route is correlated with local IgA rather than serum antibody or cytotoxic T cell reactivity. Eur J Immunol 1984; 14: 350-356.、Tamura S, Funato H, Hirabayashi Y, et al. Functional role of respiratory tract haemagglutinin-specific IgA antibodies in protection against influenza. Vaccine 1990; 8: 479-485.)。

非感染マウス群のBALF中のIgAの濃度は $10.3 \pm 6.6$  ng/mlと非常に低く、一方恐らく血清から気道分泌液中に拡散したためと思われるIgGの濃度は $460 \pm 26.2$  ng/ml

1と比較的高かった（図3A及び図4A）。非感染マウス群の10及び30mg/kg/日のアンブロキソールによる治療は、IgAの分泌を促進し、7日目及び5日目における濃度を、それぞれ約10倍上昇させ、IgGの濃度も7日目と6日目で約1.2倍と若干上昇させた。マウスをインフルエンザウイルスに感染させると、BALF中のIgA及びIgG濃度は1-2日後から際立って上昇し、7日目にIgAレベルは約400倍、IgGは6日目に11倍に上昇し、ピークに達した（図3B及び図4B）。感染マウスの10及び30mg/kg/日のアンブロキソールによる治療によって、IgAのレベルはそれぞれ7日目にベース濃度の約600倍、5日目に700倍と有意に上昇した。10及び30mg/kg/日のアンブロキソール治療は、感染マウスにおけるIgGの分泌を中度に刺激し、それぞれ6日目に約16倍、5日目に15倍に促進した。これらの結果は、感染によって誘発された粘膜免疫IgA分泌のアンブロキソールによる顕著な促進と、IgG分泌の中度促進が行われたためと推定される。従って、これら免疫グロブリンレベルの上昇も気道におけるウイルスの増殖抑制効果の一因と推定された。

#### 【0036】

##### 5) サイトカイン放出に対するアンブロキソールの作用

アンブロキソールが、*in vitro*でTNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-1、IL-4、IL-13及びIFN- $\gamma$ 等の炎症性サイトカインの放出を抑制することが報告されている（Pfeifer S, Zissel G, Kienast K, Muller-Quernheim J. Reduction of cytokine release from blood and bronchoalveolar mononuclear cells by ambroxol. *Eur J Med Res* 1997; 2: 129-132.、Gibbs BF, Schmutzler W, Vollrath IB, Brostharardt P, Braam U, Wolff HH, Zadlo-Klarwasser G. Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells. *Inflamm Res* 1999; 48: 86-93.）。インフルエンザウイルスに感染したマウスにおけるアンブロキソールの抗炎症作用を測定するために、我々は、炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ 、IL-4及びIFN- $\gamma$ 、IL-6とIL-12のような粘膜免疫を助長するサイトカイン（Boyaka PN, Marinaro M, Jackson R, Menon S, Kiyono H, Jirillo E, McGhee JR. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. *J Immunol* 1999;162:122-128.）のレベルを分析し、その結果を表3（インフルエンザA/Aichi/68(H3N2)ウイルス感染マウスのBALFにおけるサ

イトカインのTNF- $\alpha$ 、IL-12、IFN- $\gamma$ 、IL-6に対するアンプロキソールの作用)に示した。

非感染マウスのBALF中のサイトカインは、すべて検出限界を下回っていた。インフルエンザウイルスを感染させると、時間経過のパターンは異なっているが、IL-4を除くすべての試験したサイトカインのBALF中への分泌を有意に誘発した。具体的には、インフルエンザウイルスを感染させると、TNF- $\alpha$ が最初に上昇し、1日目でピークに達し、その後急速に低下し、6日目に第二の小さなピークに達した。IL-6のレベルも感染後1日目で急速に上昇し、そのレベルは高いまま維持され、5日目にピークとなったが、その後7日目に急速に低下し始めた。IL-12及びIFN- $\gamma$ の濃度はアンプロキソール投与後徐々に上昇し、それぞれ4日目と6日目にピークとなった。しかし、感染マウスのBALF中のIL-4は感染している7日間とも検出されなかった(データ未表示)。感染マウスのアンプロキソールによる治療には、3-5日目におけるTNF- $\alpha$ 、1日目におけるIFN- $\gamma$ 、4日目におけるIL-12の放出に対する抑制効果を認めたが、アンプロキソールで治療している間、その抑制効果は常に認められたわけではなかった。それに反してアンプロキソールによる治療では、感染マウスのBALFにおけるIL-6のレベルは4日目と6日目で上昇した。

【 0 0 3 7 】

【表3】

サイトカイン [pg/ml]	アンブロキソールの 用量[mg/kg/日]	ウイルス感染後の日数						
		1	2	3	4	5	6	7
TNF- $\alpha$	0	155.5 $\pm$ 36.2	124.2 $\pm$ 27.8	67.7 $\pm$ 7.3	28.9 $\pm$ 0.2	57.1 $\pm$ 15.8	64.1 $\pm$ 29.3	12.3 $\pm$ 5.2
	10	150.6 $\pm$ 21.3	108.9 $\pm$ 17.3	57.8 $\pm$ 20.2	23.1 $\pm$ 8.3	29.0 $\pm$ 8.5*	61.1 $\pm$ 24.0	9.8 $\pm$ 2.3
	30	123.5 $\pm$ 26.4	84.8 $\pm$ 18.8	35.5 $\pm$ 5.4*	19.2 $\pm$ 3.3*	45.2 $\pm$ 23.2	41.5 $\pm$ 17.0	10.6 $\pm$ 3.6
IL-12	0	22.4 $\pm$ 8.9	93.4 $\pm$ 12.1	138.3 $\pm$ 8.8	184.7 $\pm$ 8.5	74.7 $\pm$ 21.9	32.6 $\pm$ 4.7	88.3 $\pm$ 33
	10	27.3 $\pm$ 7.1	68.5 $\pm$ 12.9*	133.3 $\pm$ 17.2	119.5 $\pm$ 15.8*	57.4 $\pm$ 16.0	29.4 $\pm$ 6.2	62.5 $\pm$ 27.7
	30	22.4 $\pm$ 4.1	108.2 $\pm$ 33.3	141.5 $\pm$ 15.1	118.6 $\pm$ 11.4*	62.4 $\pm$ 13.6	44.3 $\pm$ 29.1	95.8 $\pm$ 52.2
IFN- $\gamma$	0	17.5 $\pm$ 2.6	12.6 $\pm$ 2.3	3.9 $\pm$ 0.8	7.1 $\pm$ 0.9	40.4 $\pm$ 10.8	49.5 $\pm$ 26.6	5.3 $\pm$ 2.9
	10	9.4 $\pm$ 2.4*	9.5 $\pm$ 1.8	2.8 $\pm$ 0.9	5.3 $\pm$ 2.8	14.7 $\pm$ 5.3*	39.4 $\pm$ 18.6	4.0 $\pm$ 1.6
	30	10.4 $\pm$ 2.7*	9.8 $\pm$ 2.4	4.0 $\pm$ 1.1	10.2 $\pm$ 5.5	32.8 $\pm$ 11.1	61.8 $\pm$ 21.7	5.1 $\pm$ 1.8
IL-6	0	139.1 $\pm$ 45.2	196.0 $\pm$ 22.6	268.0 $\pm$ 75.2	216.2 $\pm$ 60.2	459.8 $\pm$ 127.1	430.0 $\pm$ 63.6	72.1 $\pm$ 13.0
	10	174.8 $\pm$ 35.0	191.8 $\pm$ 51.9	280.2 $\pm$ 54.2	339.2 $\pm$ 57.1*	540.9 $\pm$ 84.2	503.23 $\pm$ 61.4	73.7 $\pm$ 14.7
	30	170.8 $\pm$ 28.9	186.7 $\pm$ 19.6	326.2 $\pm$ 44.9	433.5 $\pm$ 101.9*	478.2 $\pm$ 86.4	817.0 $\pm$ 168.0*	80.0 $\pm$ 17.5

データは平均 $\pm$ SDとして表した。各時点n=5。各日におけるアンブロキソール治療有り、無し群間の有意差はStudent's t-testによって評価した。\*P<0.05

【0038】

## 《考察》

本研究において、アンブロキソールは気道におけるインフルエンザウイルスの増殖を有意に抑制し、致死量のインフルエンザA/Aichi/68(H3N2)ウイルスによ



って感染したマウスの生存率を改善することが認められた。インフルエンザウイルスは気道に対する臓器特異性を示し、その病原性及び複製は気道における様々な宿主細胞由来の因子群及びT-細胞及びB-細胞の免疫応答によって決定されている。

動物の気道において、tryptase Clara等のトリプシン型プロテアーゼがインフルエンザウイルス複製を促進する細胞因子 (Kido H, Yokogoshi Y, Sakai K, Tashiro M, Kishino Y, Fukutomi A, Kutunuma N. Isolation and characterization of a novel trypsin-like protease found in rat bronchiolar epithelial Clara cells. *J Biol Chem* 1992; 267:13573-13579.、Tashiro M, Yokogoshi Y, Tobita K, Seto JT, Rott R, Kido H. Tryptase Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol* 1992; 66: 7211-7216.) であり、逆にプロテアーゼのインヒビターであるMPI (Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H. Human Mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. *J Biochem* 1997; 121: 309-316 .) やプロテアーゼを吸着してその活性を阻害するPS (Kido H, Sakai K, Kishino Y, Tashiro M. A pulmonary surfactant is a potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza virus. *FEBS Lett* 1993; 322: 115-119.) がウイルスの増殖を抑制する因子として報告されている。通常の気道環境内でのトリプシン型プロテアーゼの濃度は、インフルエンザウイルスの感染及び増殖を可能にする濃度に保たれており、インヒビターの濃度よりも高い。

肺胞上皮を覆うPSはtryptase Claraと結合して、そのプロテアーゼ活性を阻害する (Kido H, Sakai K, Kishino Y, Tashiro M. A pulmonary surfactant is a potential endogenous inhibitor of proteolytic activation of Sendai virus and influenza virus. *FEBS Lett* 1993; 322: 115-119.、Kido H, Murakami M, Oba K, Chen Y, Towatari T. Cellular proteinases trigger the infectivity of the influenza A and Sendai viruses. *Mol Cells* 1999; 9: 235-244.) 。インフルエンザウイルスを感染させることにより、ウイルスの増殖に必要なトリ

プシン型プロテアーゼの分泌と、そのインヒビターの分泌が共に促進された。さらに感染マウスをアンブロキソールで治療すると、各々の分泌量がさらに著明に促進されたが、その効果は、プロテアーゼとインヒビターのバランスを変化させた。感染によって誘発されたプロテアーゼの濃度はアンブロキソールによってさらに1.3-1.4倍上昇し、一方SP-A及びMPIのレベルはアンブロキソールによってそれぞれ1.5-1.7倍及び1.9倍上昇した。これらの結果は、アンブロキソールの治療によって感染マウスの気道分泌液中におけるウイルス増殖阻害作用を示す物質群の比率を上昇させ、気道内環境を未治療に比べてウイルス増殖抑制傾向を強める方向に変化させたことを示す。

さらに、アンブロキソールの作用は、図3に示したように、非感染マウス及び感染マウスの粘膜免疫IgAとIgGの放出を増大させることであった。この薬剤はIgGの分泌促進についても中度に促進した(図4)。非感染マウス群においても、アンブロキソールはIgAの放出を促進し、ベース濃度の約10倍、IgGの濃度はベース濃度の1.2倍となった。ウイルス感染後、BALF中のIgA及びIgGの濃度は際立って上昇したが、感染マウスのアンブロキソール治療によって、感染によって誘発されたIgA及びIgGの最大濃度はそれぞれさらに約1.5-1.8倍、1.45倍上昇し、アンブロキソールに起因するIgA及びIgGの濃度の上昇が、感染マウスの生存率の改善に重要な役割を果たすことを示している。

IgA及びIgG、SP-A、MPI及びトリプシン型プロテアーゼといった様々な因子の分泌がアンブロキソールによって促進される機序は理解されていないが、これらの所見は、アンブロキソールが上気道及び下気道の複数の標的細胞を刺激することを示唆するものである。マウスを10mg/kg/日という最適用量のアンブロキソールで治療すると、気道液中のウイルス増殖の阻害物質と免疫グロブリンの濃度を、感染後時間と共に徐々に上昇させ、その濃度はウイルス複製が終了する7日目まで高いままであった。しかし、より高い用量のアンブロキソールによる治療はこれらの濃度を急速に上昇させ、ピークはより早く4-5日目で達するが、そのレベルを感染中持続することはできなかった。このことが30mg/kg/日のアンブロキソールのウイルス増殖抑制効果の低い原因かもしれない。これらの結果は、気道分泌液中の阻害物質やトリプシン型プロテアーゼの合成をアンブロキソールが促

進するよりは、むしろその分泌を促進したことを示している。さらに、これらウイルス増殖阻害物質を7日間高レベルで維持することが、感染マウスの生存率改善に要求されると考えられた。

ウイルス増殖は7日目に終了したが(図2)、肺の炎症は軽度の進行を伴い続した。最近、多数の研究によって、アンブロキシソールに抗炎症作用があり(Gillissen A, Scharling B, Jaworska M, Bertling A, Rasche K, Schultze-Werninghaus G. Oxidant scavenger function of ambroxol in vitro: a comparison with N-acetylcysteine AC. Res Exp Med (Berl) 1997; 196: 389-398.)、炎症性サイトカインの産生を低減させる(Pfeifer S, Zissel G, Kienast K, Muller-Quernheim J. Reduction of cytokine release from blood and bronchoalveolar mononuclear cells by ambroxol. Eur J Med Res 1997; 2: 129-132.、Gibbs B F, Schmutzler W, Vollrath IB, Brostharardt P, Braam U, Wolff HH, Zadlo-Klarwasser G. Ambroxol inhibits the release of histamine, leukotrienes and cytokines from human leukocytes and mast cells. Inflamm Res 1999; 48: 86-93.)ことが明らかになった。本研究では、感染マウスの気道分泌液中の炎症性サイトカインのTNF- $\alpha$ 及びIFN- $\gamma$ のレベルをアンブロキシソールが抑制することが認められたが、その作用は感染中常に認められたわけではない。またIL-6及びIL-12のどちらにも、粘膜免疫の促進効果が報告されており、特にIL-12が粘膜免疫IgAの産生促進効果があると報告されている(Boyaka PN, Marinaro M, Jackson R, Menon S, Kiyono H, Jirillo E, McGhee JR. IL-12 is an effective adjuvant for induction of mucosal immunity. J Immunol 1999;162:122-128.)。感染マウスのアンブロキシソールによる治療は、4日目及び6日目でのBALF中のIL-6レベルを上昇させ、4日目でのIL-12のレベルを一過性に抑制した。

アンブロキシソールには、トリプシン型プロテアーゼレベルの上昇やIL-12の放出の一過性の抑制のように、インフルエンザウイルスに対する生体防御システムにとって不利と推定される作用も一部認められるが、アンブロキシソール治療は、全体的には気道分泌液中のウイルス増殖抑制効果を示す生体内因子群の濃度を著明に増加させ、その結果気道内ウイルス増殖を抑制してマウスの生存率を有意に改善させた。このうちインフルエンザウイルスの増殖抑制に関与するアンブロキ

ソール作用は、SP-A、MPI、IgA、IgG等の気道内濃度の上昇、また気道中の炎症性サイトカイン放出の抑制によって説明されるであろう。これらの結果は、アンブロキソールをインフルエンザAウイルス感染の治療または予防として臨床使用できるであろうことを示唆している。

### 【0039】

#### 【発明の効果】

インフルエンザは、一般に流行する傾向があり、その流行については報道されることが多い。従って、本発明の抗インフルエンザ剤は、報道後にあっては、その流行疾患の予防剤として利用でき、発症後にあっては、その疾患の治療剤として利用できる。特に、本発明のインフルエンザウイルス感染の治療または予防剤は、原因ウイルスが、外膜糖蛋白を有するウイルスであって気道部に感染し増殖するもの、例えば、インフルエンザウイルスによって発症するウイルス疾患に効果的に適用できる。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

アンブロキソールがインフルエンザAウイルス感染マウスの生存率を上昇させることを示す図面である。

##### 【図2】

BALF中のウイルス増殖に対するアンブロキソールの抑制作用(A)、及び感染後4日目のマウスにおける肉眼的肺病変を示す図面である。

##### 【図3】

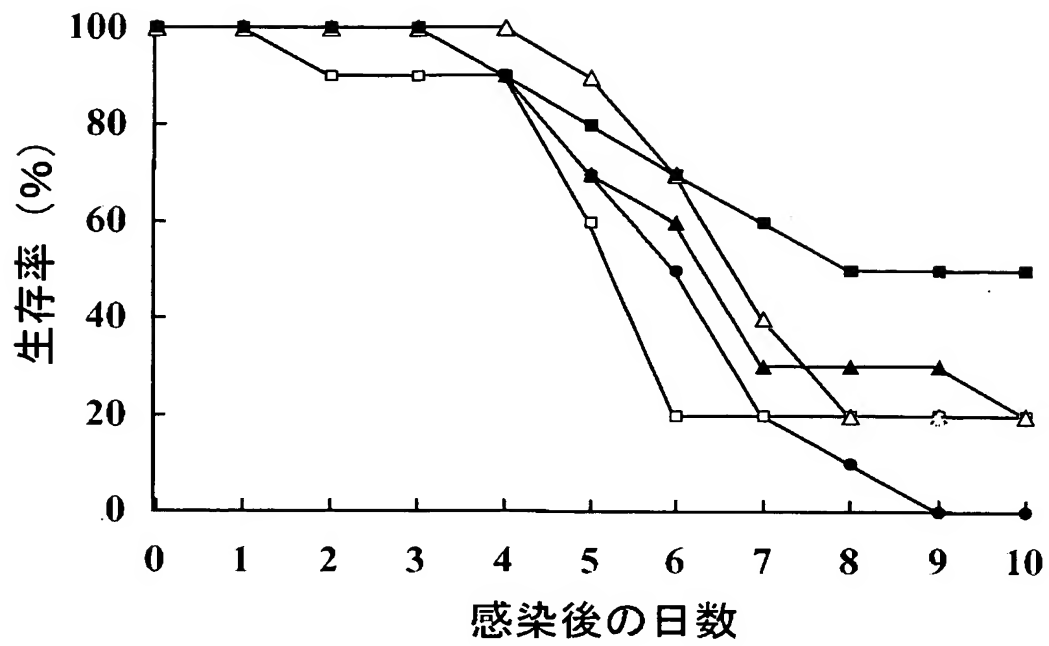
非感染マウス群(A)及びインフルエンザAウイルス感染マウス群(B)のBALFにおける粘膜免疫IgA濃度に対するアンブロキソールの刺激作用を示す図面である。

##### 【図4】

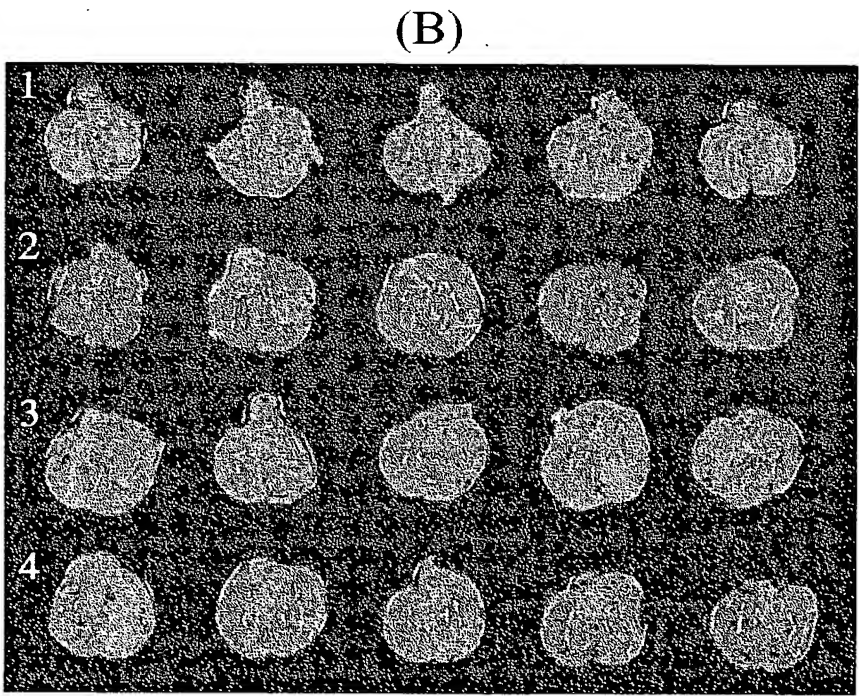
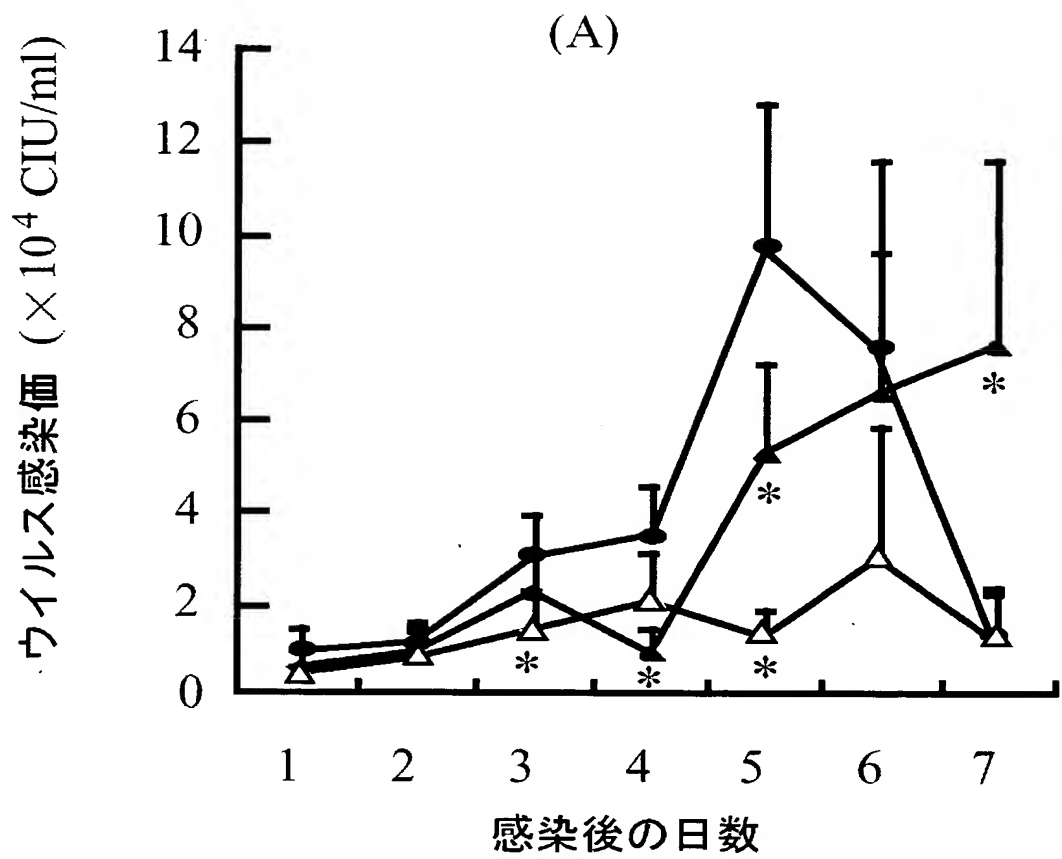
非感染マウス群(A)及びインフルエンザAウイルス感染マウス群(B)のBALFにおける粘膜免疫IgG濃度に対するアンブロキソールの刺激作用を示す図面である。

【書類名】 図面

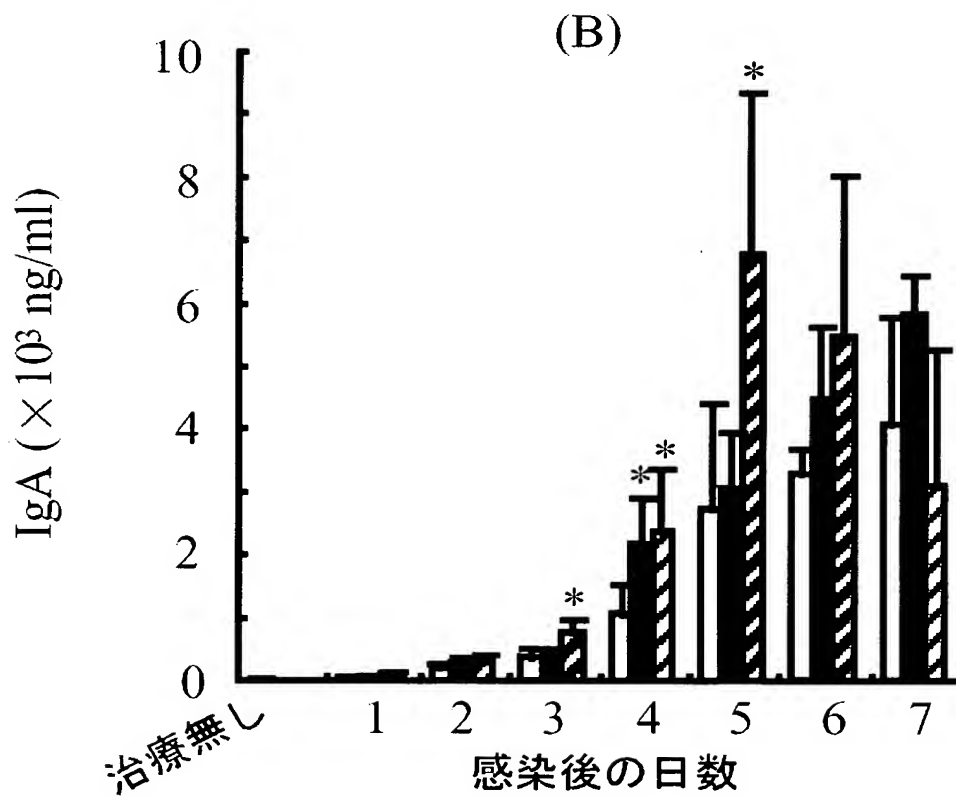
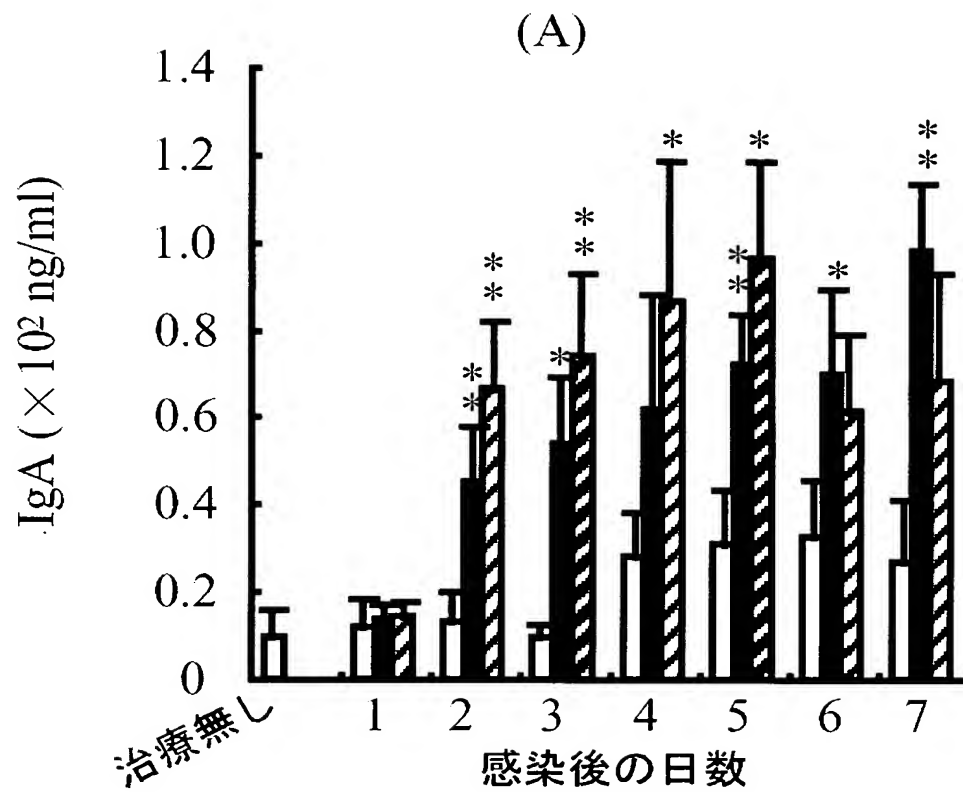
【図 1】



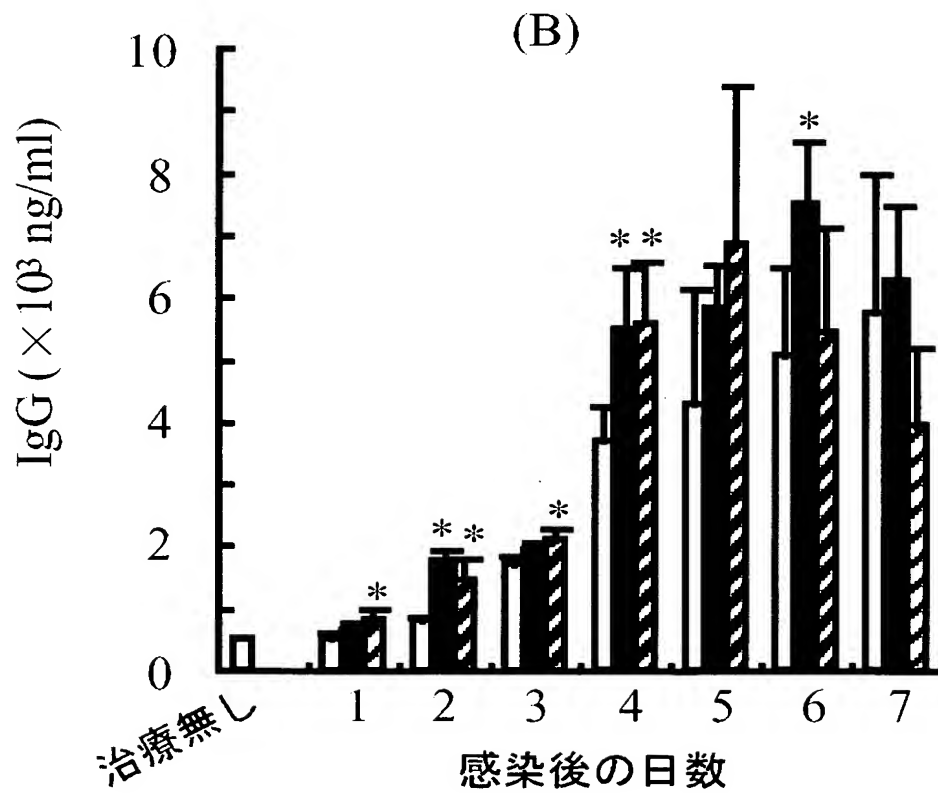
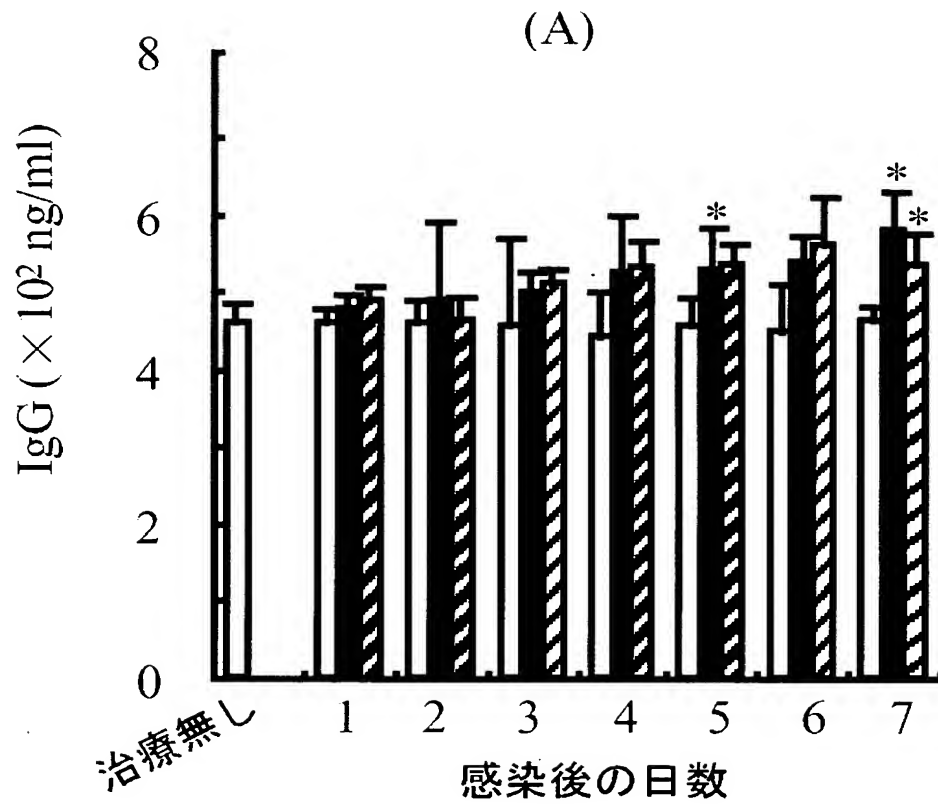
【図 2】



【図 3】



【図 4】





【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 インフルエンザウイルス感染の治療または予防剤を提供すること。

【解決手段】 アンブロキシールまたはその薬理学的に許容されうる塩を有効成分とする抗インフルエンザ薬。気道分泌液中に含まれるインフルエンザウイルス作用を示す生体内因子の分泌促進により、抗インフルエンザ作用を持つことを特徴とする。インフルエンザウイルスの感染性を誘起する気道内プロテアーゼに対する阻害物質の分泌促進を介して、気道におけるインフルエンザウイルス増殖を抑制することを特徴とする。粘膜免疫物質のIgAとIgGの分泌促進を介して、気道におけるインフルエンザウイルス増殖を抑制することを特徴とする。気道中の炎症性サイトカイン放出を抑制することを特徴とする。インフルエンザウイルス感染の治療または予防剤である。

【選択図】 図 1

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 1 - 2 6 7 2 3 6
受付番号	5 0 1 0 1 2 9 6 0 9 6
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 3 年 9 月 1 2 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成13年 9月 4日

次頁無

特願 2 0 0 1 - 2 6 7 2 3 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 0 1 1 0 3 0 0 0 ]

1. 変更年月日	2 0 0 1 年 3 月 1 4 日
[変更理由]	新規登録
住 所	香川県高松市丸の内 2 番 5 号
氏 名	株式会社テクノネットワーク四国

特願 2 0 0 1 - 2 6 7 2 3 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [ 5 9 2 2 1 4 9 1 1 ]

1. 変更年月日	1 9 9 4 年 1 0 月 2 7 日
[変更理由]	住所変更
住 所	兵庫県川西市矢間 3 丁目 1 0 番 1 号
氏 名	日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社

特願 2 0 0 1 - 2 6 7 2 3 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 0 0 1 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 2 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市中央区南本町 1 丁目 6 番 7 号

氏 名

帝人株式会社